

(71) Applicant: Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.

1-6-1 Ohtemachi, Chiyoda-ku, Tokyo

SPECIFICATION

1. Title of the Invention

FEED FOR RED COLOR FISH AND FARMING METHOD OF RED COLOR FISH

2. Claims for the Patent

(1) Feed for red color fish characterized by containing fatty acid ester of astaxanthin.

(2) A red color fish farming method characterized in that fatty acid ester of astaxanthin is supplied to red color fish.

3. Detailed Description of the Invention

Industrial Application Field

The present invention relates to feed which improves the body color of cultured fish. More specifically, the present invention relates to feed which improves the body color of red color fish.

Further, the present invention relates to a fish farming method to improve the body color of red color fish.

Conventional Art

The flesh color of salmon and trout and the body color of red sea bream mainly comes from astaxanthin, and methods to improve the flesh color and the body color by supplying feed supplemented with astaxanthin to cultured fish are known (Japanese Patent Laid-Open No. 54-70995, Japanese Patent Laid-Open No. 57-206342, Japanese Patent Laid-Open No. 48-12798).

However, carotenoid is generally an unstable pigment, and it is easily degraded by light, in particular ultraviolet rays. Astaxanthin is not an exception, and it has been found that astaxanthin has an extremely poor stability in an aqueous solution or in feed.

Problems to be Solved by the Invention

Therefore, development of technology to improve light resistance of astaxanthin has been demanded. The invention proposed here aimed at solving this problem.

Means for Solving the Problems

The inventors have conducted intensive studies to solve the problem mentioned above, and have found that the stability of astaxanthin in an aqueous solution or in feed remarkably is improved by esterifying a hydroxy group of astaxanthin with fatty acid and thus completed the present invention.

That is, the present invention is directed to feed for red color fish characterized by containing a fatty acid ester of astaxanthin.

In another aspect, the present invention is directed to a farming method of red color fish characterized by supplying an astaxanthin fatty acid ester to red color fish.

Hereinbelow, constitution of the present invention is described in detail.

(Fatty acid esters of astaxanthin)

As the fatty acids which can be used for esterification of astaxanthin, saturated or unsaturated fatty acids such as linoleic acid, oleic acid and palmitic acid can be used, but they are not limited to these higher fatty acids, and lower fatty acid can be used as well.

Fatty acid esters of astaxanthin are known compounds [for example, "Helvetica Chimica Acta (Helv. Chim. Acta) Vol. 61, page 2609 (1978)] and as production methods thereof, conventional methods to conduct esterification of alcohols can be used.

In order to describe synthetic methods of fatty acid ester of astaxanthin, Reference Examples 1 and 2 are shown in which astaxanthin dipalmitoyl ester is synthesized selecting palmitic acid as an example of the fatty acid.

Referential Example 1

26 mg of astaxanthin was dissolved in 10 ml of tetrahydrofuran, and 0.5 ml of pyridine and 0.8 ml of palmitoyl chloride were added. The reaction was performed at room temperature overnight. 50 ml of ethyl acetate was added to the reaction liquid and esterified astaxanthin was extracted. The

ethyl acetate layer containing esterified astaxanthin was washed with water, and then with a saturated saline solution, and after dried over anhydrous sodium sulfate, concentrated to obtain 40 mg of oily astaxanthin dipalmitoyl ester.

Referential Example 2

Astaxanthin was extracted from crush body of *Phaffia rhodozyma* yeast with acetone and the extracted liquid was concentrated and the solvent was exchanged to ethyl acetate, the extract was concentrated to obtain an oily roughly purified product containing 0.18% astaxanthin dipalmitoyl ester. About 10 g of this oily substance was dissolve in a little amount of chloroform and allowed to be adsorbed by silica gel column (120 ml). After the column was washed with 200 ml of hexane, astaxanthin was eluted as the ethyl acetate concentration was gradually increased from a solvent having a composition of hexane: ethyl acetate = 50:1. These were collected and concentrated to obtain about 95 mg of roughly purified product (astaxanthin content of 10 to 20%).

170 mg of this roughly purified astaxanthin was dissolved in 10 ml of tetrahydrofuran, added with 0.5 ml of pyridine and 0.8 ml of palmitoyl chloride, and reacted at room temperature overnight. 50 ml of ethyl acetate was added to the reaction liquid and insolubles were filtered off. The ethyl acetate layer was washed with water and then with a saturated saline solution, and after dried over anhydrous sodium sulfate, dried to solid by evaporating the solvent. The residual liquid was dissolved in a little amount of hexane, and purified with a silica gel column

(50 ml) as above. The eluted fractions by hexane: ethyl acetate = 10:1 were collected and concentrated to obtain 263 mg of astaxanthin dipalmitoyl ester.

Examples

Example 1

The stability in feed of astaxanthin dipalmitoyl ester prepared by the above Referential Examples was examined.

127 mg of astaxanthin dipalmitoyl ester obtained by Referential Example 2 was added to 100 g of feed for sea bream (white fish meal: about 65%, starch: about 25%, beer yeast: about 4%, soybean cake: about 4% and mineral and others: about 2%) and divided to portions (each 10 g). Some were allowed to stand at 5°C whereas the others at 30°C for 90 days and the stability of astaxanthin esters was examined. As control feed, feed for sea breams containing Phaffia rhodozyma yeast extract, krill extract and Carophyll pink were prepared and used. The results were as shown in the following table and judging from the residual rate of astaxanthin, it has been found that astaxanthin dipalmitoyl ester is extremely stable as compared with the other samples.

Storage temperature	Cell body extract	Krill extract	Carophyll pink	Astaxanthin dipalmitoyl ester
5°C	82%	95%	55%	95%
30°C	46%	72%	40%	93%

Example 2

The same amount of water was added to the feed for fisheries containing astaxanthin dipalmitoyl ester shown in Example 1 to prepare feed for red sea bream.

The above feed was used for the first test group and feed containing astaxanthin of the same mol amount in substitution for astaxanthin dipalmitoyl ester of the above feed was used for the second test group and feed for the first test group from which astaxanthin dipalmitoyl ester was removed was used for the third test group.

In the breeding test, 13 individuals of red sea bream (length 15 to 17 cm) younger than one year were used for each test group and after bred at 24 to 25 °C for four weeks, color of the red sea bream was determined. Feed was cast twice a day with about 10 g/13 individuals.

Test group	Color of red sea bream epidermis
1	Denser than control group
2	Slightly denser than control group
3	(Control group)

The color tone of red sea bream bred in the first test group was close to or better than the body color of natural red sea bream.

Example 3

In the production method of astaxanthin dipalmitoyl ester of Referential Example 1, caproic acid $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$ was used in substitution for palmitic acid and astaxanthin dicaproyl ester

was prepared. 130 mg of this astaxanthin dicaproyl ester was admixed in 100 g of feed for sea bream as in Example 1 and stability of the samples (each 10 g) in the feed of astaxanthin dicaproyl same as Example 1 was examined.

As the results shown in the following table, astaxanthin dicaproyl ester was extremely stable in comparison with the other samples.

Storage temperature	Cell body extract	Krill extract	Carophyll pink	Astaxanthin dipalmitoyl ester
5°C	80%	95%	60%	94%
30%	40%	65%	55%	94%

Advantages of the Invention

The feed of the present invention is excellent in light resistant as well as in the other stability in the air and in water and when red sea bream is bred using this feed, the color tone close to or better than the body color of natural red sea bream can be attained.

⑫ 公開特許公報(A) 平1-202261

⑤ Int. Cl.⁴ 識別記号 庁内整理番号 ⑬ 公開 平成1年(1989)8月15日
 A 23 K 1/18 1 0 2 A-6754-2B
 // A 23 K 1/16 3 0 1 H-6754-2B
 審査請求 未請求 請求項の数 2 (全3頁)

⑭ 発明の名称 赤色魚用餌料と赤色魚の養殖方法

⑮ 特 願 昭63-26678

⑯ 出 願 昭63(1988)2月9日

⑰ 発 明 者 坂 戸 邦 昭 神奈川県厚木市上荻野987-37
 ⑰ 発 明 者 持 田 頌 一 神奈川県平塚市真田325-5
 ⑰ 発 明 者 西 中 弘 興 山口県宇部市藤山5-1
 ⑰ 発 明 者 安 部 敏 男 千葉県千葉市幕張本郷7-11-11
 ⑱ 出 願 人 協和醸酵工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号
 ⑲ 代 理 人 弁理士 井坂 實夫 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

赤色魚用餌料と赤色魚の養殖方法

2. 特許請求の範囲

- (1) アスタキサンチンの脂肪酸エステルを含有することを特徴とする赤色魚用餌料。
 (2) アスタキサンチンの脂肪酸エステルを赤色魚に投与することを特徴とする赤色魚の養殖方法。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は養殖魚類の体色を改良する餌料に関する。詳しくいえば本発明は、赤色魚の体色を改良する餌料に関する。

また、本発明は赤色魚の体色を改良する養殖方法にも関する。

従来の技術

さけ・ます類の肉色やマダイ類の体色は、主としてアスタキサンチンに由来し、養殖魚にアスタキサンチンを添加した餌料を供することにより、

肉色および体色を改善する方法が知られている(特開昭54-70995号公報、特開昭57-206342号公報、特公昭48-12798号公報)。

しかしながら一般にカロチノイドは不安定な色素であって、光、特に紫外線によって容易に分解される。アスタキサンチンも例外ではなく、水溶液あるいは餌料中での安定性が極めて乏しいことが判明した。

発明が解決しようとする課題

したがってアスタキサンチンの耐光性を改善する技術の開発が望まれていた。ここに提案する発明は、この課題を解決することを目的とするものである。

課題を解決するための手段

発明者らは上記の課題を解決しようとして研究した結果、アスタキサンチンの水酸基を脂肪酸でエステル化することによって、水溶液あるいは餌料中でのアスタキサンチンの安定性が大幅に向上することを見出し、本発明を完成したものであ

る。

すなわち本発明は、アスタキサンチンの脂肪酸エステルを含有することを特徴とする赤色魚用飼料である。

また他面において、本発明はアスタキサンチンの脂肪酸エステルを赤色魚に投与することを特徴とする赤色魚の養殖方法でもある。

本発明の構成について以下に詳説する。

(アスタキサンチンの脂肪酸エステル)

アスタキサンチンをエステル化する脂肪酸としては、リノール酸、オレイン酸、パルミチン酸などの飽和又は不飽和脂肪酸を使うことができるが、これらの高級脂肪酸に限られることはなく、低級脂肪酸をも使用することができる。

アスタキサンチンの脂肪酸エステルは公知化合物〔例えば「ヘルベチカ・ヒミカ・アクタ(Helv. Chim. Acta)第61巻、第2609頁(1978年)〕であって、その製法としては、アルコール類をエステル化するための慣用方法を使用することができる。

含む油状粗精製物を得た。この油状物質約10gを少量のクロロホルムに溶解し、ヘキサン中で充填したシリカゲルカラム(120mℓ)に吸着させ、ヘキサン200mℓで洗浄後、ヘキサン：酢酸エチル=50：1の組成の溶媒から徐々に酢酸エチル濃度を増加させてゆくとアスタキサンチンが溶出される。これを集めて濃縮し、約95mgの粗精製物(10ないし20%のアスタキサンチンを含有する。)を得た。

このアスタキサンチン粗精製物170mgを10mℓのテトラヒドロフランに溶解し、0.5mℓのピリジンと0.8mℓのパルミトイルクロリドを加え、室温で一晩反応させた。反応液に50mℓの酢酸エチルを加えて不溶物を濾別し、酢酸エチル層を水で洗浄し、ついで飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥後、蒸発乾固した。残液を少量のヘキサンに溶解し、上述と同様にシリカゲルカラム(50mℓ)で精製し、ヘキサン：酢酸エチル=10：1の溶出区分を集めて濃縮し、263mgのアスタキサンチンジバ

アスタキサンチンの脂肪酸エステルの合成方法を説明するために、脂肪酸の例としてパルミチン酸を選択し、アスタキサンチンジパルミトイルエステルの合成例を参考例1及び2として示す。

参考例1

アスタキサンチン26mgを10mℓのテトラヒドロフランに溶解し、0.5mℓのピリジンと0.8mℓのパルミトイルクロリドを添加し、室温で一晩反応させた。反応液に酢酸エチル50mℓを加えてエステル化されたアスタキサンチンを抽出し、エステル化されたアスタキサンチンを含有する酢酸エチル層を水で洗浄し、ついで飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウム上で乾燥した後に濃縮し、油状のアスタキサンチンジパルミトイルエステル40mgを得た。

参考例2

ファッフイアロドチーマ(Phaffia rhodozyma)酵母の菌体破砕物からアスタキサンチンをアセトンで抽出し、抽出液を濃縮し、酢酸エチルに転溶した後に濃縮し、アスタキサンチン0.18%を

ルミトイルエステルを得た。

実施例

実施例1

上記の参考例によって調製されたアスタキサンチンジパルミトイルエステルの飼料中の安定性を検討した。

参考例2で得られたアスタキサンチンジパルミトイルエステル127mgを飼用飼料(ホワイティッシュミール約65%、澱粉約25%、ビール酵母約4%、大豆粕約4%、ミネラルその他約2%)100gに加え、各10gに分けて、あるものは5℃に、他のものは30℃に90日間放置し、アスタキサンチンエステルの安定性を検討した。対照飼料としてファッフイア・ロドチーマ酵母抽出物、オキアミ抽出物およびカロフィルピンクを含む飼用飼料を調製使用した。その結果は下表に示すように、アスタキサンチンの残存率から判定すると、アスタキサンチンジパルミトイルエステルは他の試料に比較して極めて安定であることが判明した。

保 存	固 体	オキア	カ ロ	アスタキ
		ミ 抽 出	フィ ル	サンチン
				ジバルミ
				トイルエ
温 度	抽 出 物	物	ピ ン ク	ス テ ル
5℃	82%	95%	55%	95%
30℃	46%	72%	40%	93%

実施例 2

実施例 1 で示したアスタキサンチンジバルミトイルエステルを含有する水産用飼料に同量の水を加えて、マダイ用飼料を調製した。

第 1 の試験区には上記飼料を使用し、第 2 の試験区には、上記飼料のアスタキサンチンジバルミトイルエステルの代わりに等モル量のアスタキサンチンを含む飼料を使用し、第 3 の試験区には第 1 試験区の飼料からアスタキサンチンジバルミトイルエステルを除いた飼料を使用した。

飼育試験には当才のマダイ（体長 15～17 cm）を各試験区に 13 匹ずつ使用し、24 日

し、その各 10 g を使用し、実施例 1 と同じアスタキサンチンジカプロイルエステルの飼料中における安定性を検討した。

次表に結果を示すとおり、アスタキサンチンジカプロイルエステルは、他の試料と比較して極めて安定であった。

保 存	固 体	オキア	カ ロ	アスタキ
		ミ 抽 出	フィ ル	サンチン
				ジバルミ
				トイルエ
温 度	抽 出 物	物	ピ ン ク	ス テ ル
5℃	80%	95%	60%	94%
30℃	40%	65%	55%	94%

発明の効果

本発明の飼料は、空気中および水中において耐光性その他の安定性が優れ、この飼料を使用してマダイを飼育すれば、その色調は天然マダイの体色に近いが、それを上回るものが得られる。

し 25℃で 4 週間飼育した後、マダイの色調を判断した。投餌は 1 日に 2 回行い、1 回につき約 10 g / 13 匹を与えた。

試験区	マダイ表皮の色調
1	対照区に比べて濃い
2	対照区に比べて少し濃い
3	(対照区)

第 1 の試験区で飼育されたマダイの色調は、天然マダイの体色に近いが、それを上回るものであった。

実施例 3

参考例 1 のアスタキサンチンジバルミトイルエステルの製法において、バルミチン酸の代わりにカプロン酸 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$ を使い、アスタキサンチンジカプロイルエステルを調製した。このアスタキサンチンジカプロイルエステル 130 mg を実施例 1 と同様に飼用飼料 100 g に混入